

# 甘藷の澱粉分解酵素に関する研究 (第3報)

—電子顕微鏡による酵素構造の直接観察についての予備的研究—

大 井 嘉 子

## I 緒 言

従来より、酵素体の一次構造は、もっぱら、化学的手段で解析がなされ、相当の知識が得られている。<sup>1,2)</sup>しかし、酵素体の活性に関しては、たんに、一次構造のみでなく、高次構造に関連し、従って、酵素体の立体的構造の解析が必要になる。しかし、構造解析手段としてのX線では、高分子中に含まれる多数の原子数のために、多数の回折斑点を必要とし、さらに、位相決定が非常に困難であり、解析例は数すくないのが現状である。しかし、もし、電子顕微鏡で、<sup>3)</sup>高分子構造の可視化が可能になるならば、構造解析は非常な進歩をとげるであろうと考えられ、<sup>4,5)</sup>酵素活性と構造との関係を解明することが容易であろう。

著者は、甘藷中の糊精化・糖化の各酵素が、ゲルろ過で、かなり良好に分離されるということ、超遠心機法によって確かめた。<sup>6)</sup>本報では、純粋な酵素蛋白質結晶を成長させ、その構造解析をするための予備的段階として、甘藷の各精製酵素液から適当な方法によって結晶化を試みた。一方、電子顕微鏡中では、高真空であるために、酵素構造が空気中と異なる可能性があると考えられるので、<sup>7)</sup>電子線回折<sup>8)</sup>により求められる面間隔と、X線から求められるそれらとの同定を行なった。

## II 実験方法

### 1. 酵素溶液の調製

前報<sup>6)</sup>の調製法に従って、塩化カルシウム・熱処理した甘藷上澄液に硫酸塩析をほどこし、20~30% (w/v%) 沈殿部分を採取して同重量の蒸留水で溶かし、試料粗酵素液とした。この粗酵素液を Sephadex G-100カラム (1.8×37~44cm) を用いて、蒸留水にてゲルろ過し、適当な酵素活性 (比活性) を持つ溶出画分 (3ml, 15ml) を採取し、結晶化<sup>9)</sup>のために、次項の処理をほどこした。なお、糊精化・糖化力測定は、おのおの、既報<sup>6,10)</sup>と同様に、Wohlgemuth 改変法、Hanes の測定法を利用した。

### 2. 結晶化のための処理

#### a. アセトンによる結晶化

ゲルろ過によって得られた溶出画分の中から、糊精化・糖化のおおの活性力大なる部分を 15ml ずつ採取し、そのおのおのに、酵素液量とほぼ同量のアセトンを加えて、約0°C にて冷却し、沈殿が十分に沈むのを待って上澄液を取り除き、デシケーター中で、アスピレーターを用いて、2日間がかりで十分によく乾燥させた。

#### b. 硫酸溶液による結晶化

##### (i) 低濃度溶液からの結晶化

各酵素力大なる画分 3ml に、硫酸溶液を添加し、0.1飽和とさせ、約6週間冷蔵庫にて静置し、その後、アスピレーターにて、2~3日間徐々に溶液を濃縮させ、粉末状にした。

##### (ii) 高濃度溶液からの結晶化

糊精化力大なる画分 3ml を硫酸飽和0.2とさせ、生じた沈殿物を遠心分離して集め、その上から、さらに、硫酸溶液及び塩化カルシウム溶液 (0.2 飽和) をおのおのの画分に加えた。この溶液を約6週間冷蔵庫にて静置し、おのおの、2, 4日間、アスピレーターにて吸引して粉末状にした。

### 3. 結晶の検出

大量に生成した粉末試料のための検出には、X線回折装置 (D-1A, 理学電機) と、電子顕微鏡 (JEM-7, 日本電子) を併用し、少量試料の場合は、電子顕微鏡のみを用いた。X線回折にかける場合は、スライドガラスを適当な大きさに切り、X線のあたる部分にサンドペーパーですりを入れ、微粒子にした粉末試料を  $1.5 \times 2.5 \times 0.5 \text{ cm}^3$  程度付着させた。ターゲットは Cu ( $K\alpha$  1.5405Å), フィルターは Ni を使用した。電子顕微鏡にかける場合<sup>11)</sup>は、蒸留水にて粉末試料の希薄溶液を作り、それを、電子顕微鏡試料台上にあらかじめ張ったホルムバール、または、カーボン支持膜上に滴下し、乾燥させた後、電顕試料とした。これらのほかに、粉末試料中の結晶検出確認のために、偏光顕微鏡を使用した。

### Ⅲ 結 果

#### 1. アセトンによる結晶

アセトンパウダーは、非常に軽いかつ少量であるが、X線回折試料としては十分に足る量であった。そのう

ちの、糖化酵素活性大なる画分のアセトンパウダーからは、結晶性の回折ピークを得ることができず、 $2\theta = 20^\circ$  付近に極大点を持つ非晶質ライン（図1—a）のみを示した。一方、糊精化酵素活性大なる画分からは、図1—bに示されているように、明らかに硫酸の

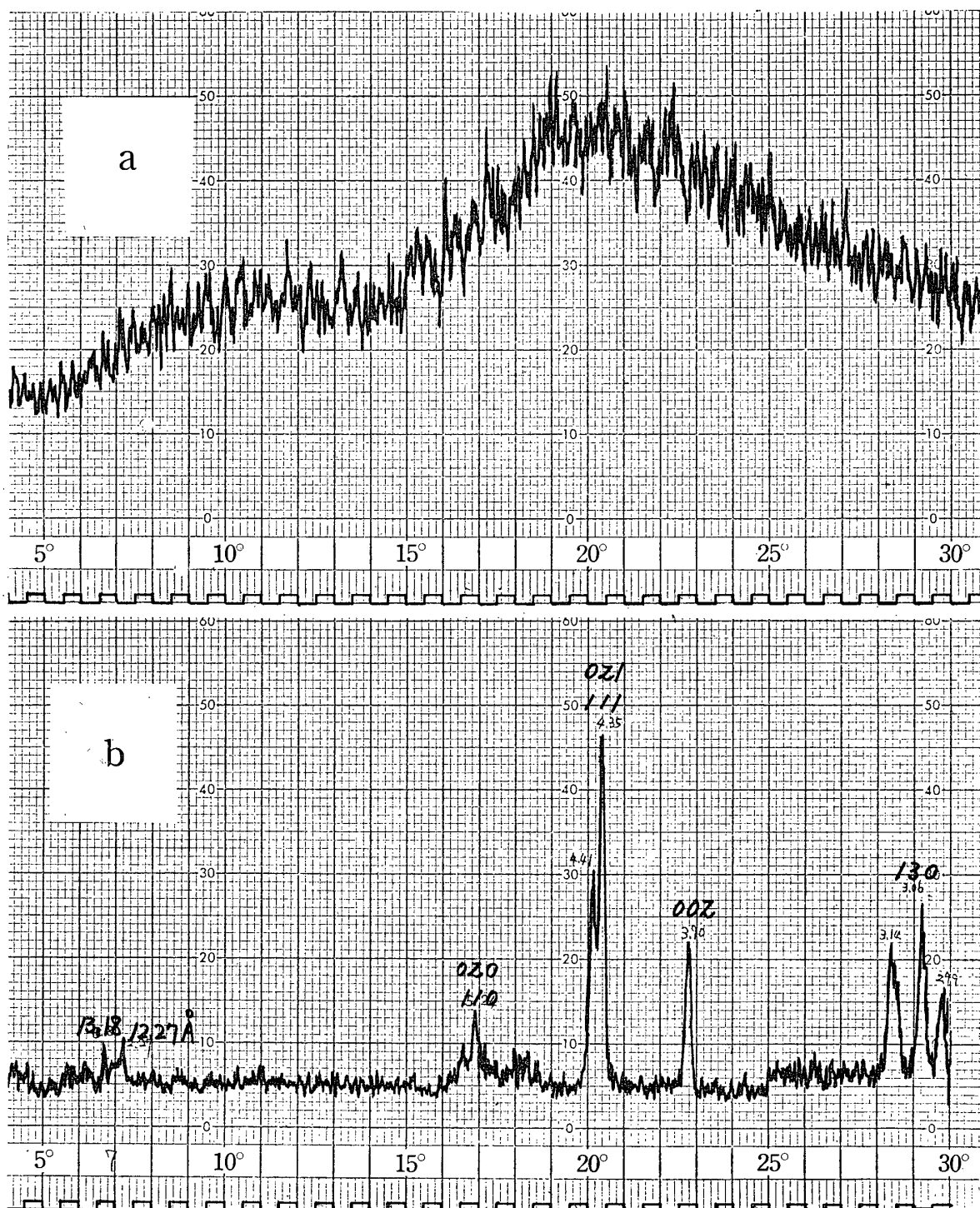


図1 アセトンパウダーのX線回折  
a : 糖化酵素活性大なる画分  
b : 糊精化酵素活性大なる画分

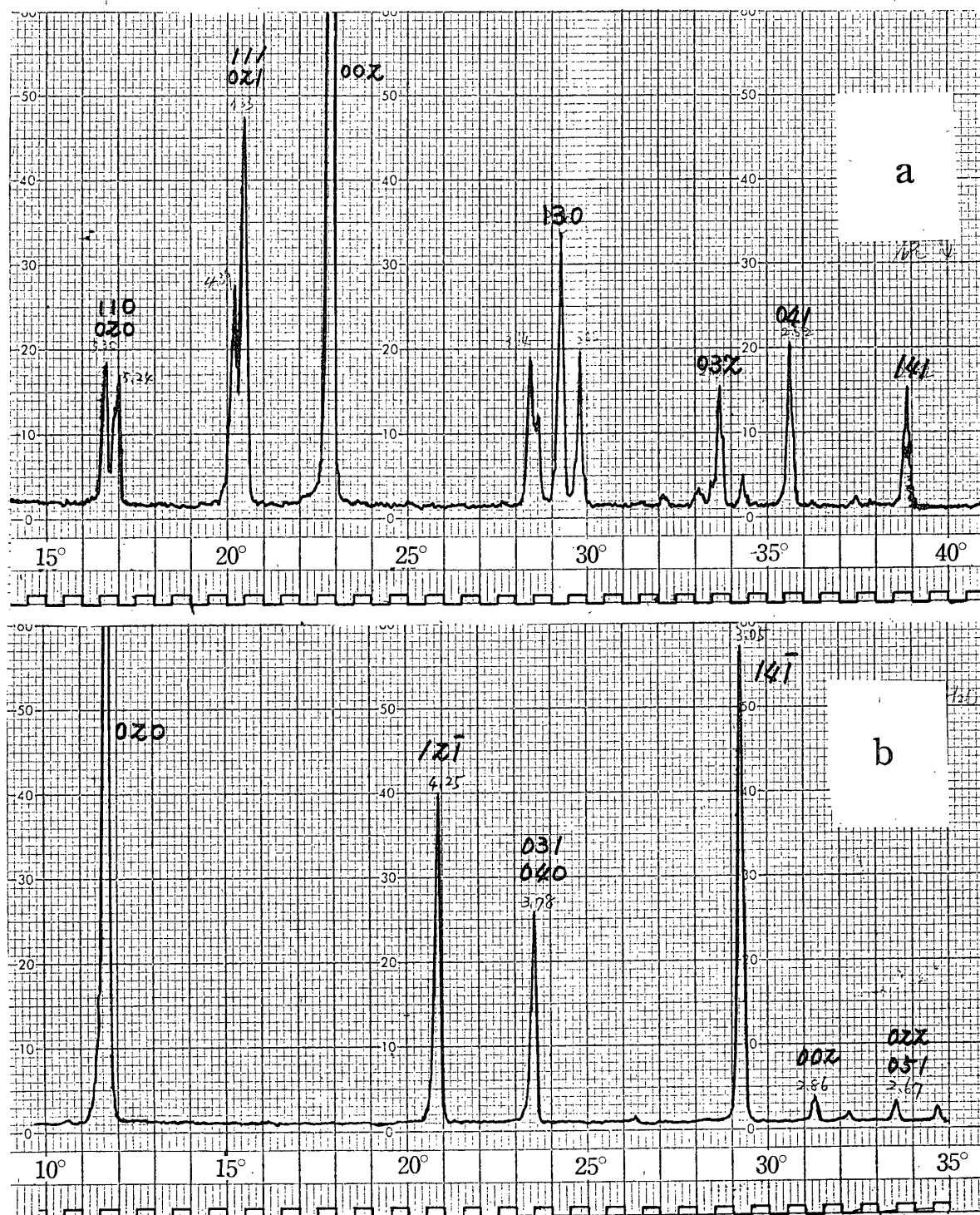


図2 標準物質のX線回折  
a : 特級試薬  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
b : 特級試薬  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

回折ピーク（図2-aを参照）のほかに、 $2\theta=6.7^\circ$ 、 $7.2^\circ$ にも微少なピークがあらわれた。このおのおのの面間隔 $d$ は、 $13.18\text{\AA}$ 、 $12.27\text{\AA}$  となり、明らかに、酵素精製中に添加した無機物及びそれらの組み合わせによって考えられる無機物の最大面間隔<sup>12,13)</sup>とは異なる。

また、これらのパウダーからの電子線回折<sup>14)</sup>では、最大面間隔（TCNQ<sup>注1</sup>を対照として計算） $31.5\text{\AA}$ 、 $15.7\text{\AA}$ 等が観察された。ただ、その際に、無機物結晶と比較して、多くの回折像の強度は低く、はっきりとした像が得られず、ハロ現象をともなっていて、結晶

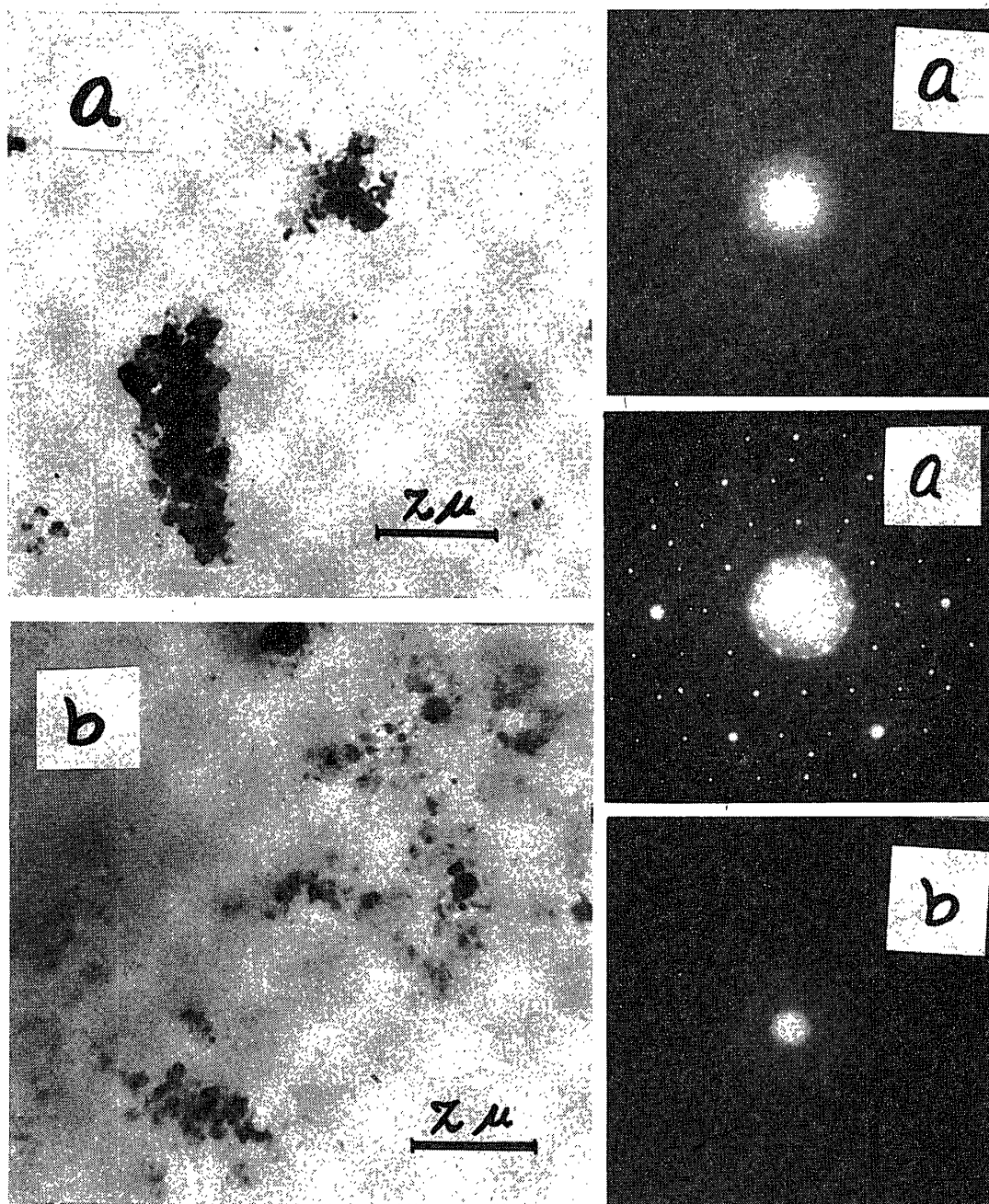


図3 アセトンパウダーの電子顕微鏡写真と回折像

の形はぼんやりとしている。(図3)

## 2. 低濃度硫安溶液からの結晶

X線回折では、硫安そのものの回折ピークのみが得られたが、電子線回折では、最大面間隔 $7.67\sim 8.69\text{\AA}$ なる回折像が得られた。これは、仮に、無水塩にならずに $\text{CaSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が存在した時の最大面間隔( $7.61$ または $7.56\text{\AA}$ )よりも大きく、また、同試料の中から得られた最大面間隔 $22.1\text{\AA}$ (図4)をも考え合わせると、添加無機物以外の回折像であると考えられる。

3. 高濃度硫安及び塩化カルシウム溶液からの結晶  
硫安—硫安溶液からの結晶は、X線回折では、硫安

の回折パターンを示し、電子線回折では、硫酸カルシウムもしくは塩化カルシウムの存在を示している(図5-a)。しかし、もし、ともに無水物結晶のみが存在しているとする、最大面間隔 $5.83, 6.08, 6.59, 7.08\text{\AA}$ は、それらに対応するものよりも、かなり大きすぎることになる。含水塩であれば、考えられる面間隔ではある。硫安—塩化カルシウム溶液からの粉末化は、なかなか容易ではなく、長時間アスピレーターでひかねばならなかった。この粉末は潮解性を示し、偏光顕微鏡の観察中にどんどん溶けていった。非常に小さな部分部分で偏光した。これらのことから、塩化カ

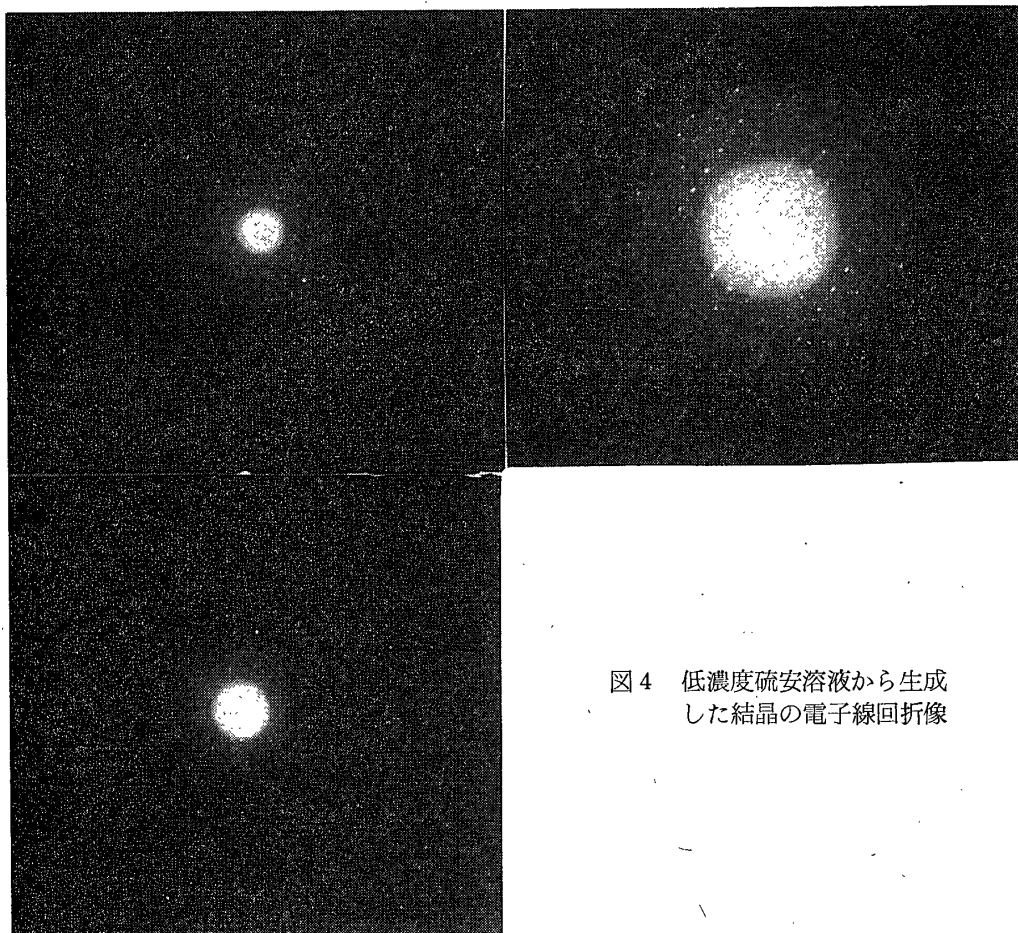


図4 低濃度硫酸溶液から生成した結晶の電子線回折像

ルシウムであると推定された。もちろん、これらの結晶の間に、結晶 habit のはっきり出た硫酸らしき結晶も、ごくわずかではあるが存在していた。電子回折像を見ると、その面間隔（最大面間隔  $3.5\text{\AA}$  程度）からも、硫酸カルシウム無水結晶であることがわかった。

（図5—b）これらの無機物以外の顕著な回折像は、面間隔を読み取れるほどのものは見つけ出せなかった。

#### IV 考 察

##### 1. アセトンによる結晶

糖化酵素画分のアセトンパウダーからのX線回折が非晶質ラインを示したと言うことは、今だ完全に結晶化されていないのか、もしくは、ブラッグ条件を満足していても十分な回折像を与える結晶が存在しなかった、つまり、結晶量が少なかったかのどちらかであるが、電子回折では結晶存在を示していることから、後者の理由によると考えられる。このことは、偏光顕微鏡による観察から判断しても妥当な考えであろう。図6は、多くの非晶質の中に存在している結晶の顕微鏡写真を示している。大小の結晶が存在し、そのおのおのの中心部はラ線状をなしている。これらの結晶は、

おのおのが多くの部分に分かれて偏光していることから判断すると、角度の少しづつ違った面を持っているのか、それとも、多くの多結晶が集合体をなしているのかのどちらかと想像できる。それで、これほどの結晶が存在しているのにX線回折像が得られないのは、これが多形をなしていて準安定型（または不安定型）となっていたのかかもしれない。<sup>15)</sup> とにかく、この画分が、超遠心機法では、糖化酵素のみのパターンを示し、<sup>6)</sup> かつ、電子線回折では、添加無機物よりはるかに大きい面間隔を持つ結晶を含んでいて、しかも、他のような硫酸による結晶化と違った結晶の形を持つということは、特筆すべきことである。なお、X線回折に対しては、結晶部分だけを選択的に取り出し、微量試料でも測定できるデバイシェーラー法<sup>16)</sup> の使用によって、判明させることができるかもしれない。その場合、長時間（1～2時間）X線照射しなければならないので、新たな問題を引き起こすかもしれない。また、糊精化酵素画分からの回折ピークが硫酸を含み、かつ、偏光顕微鏡でも硫酸とおぼしき結晶形を示していること等は、ゲルろ過の際に問題となった事柄<sup>6)</sup> に起因しているようである。



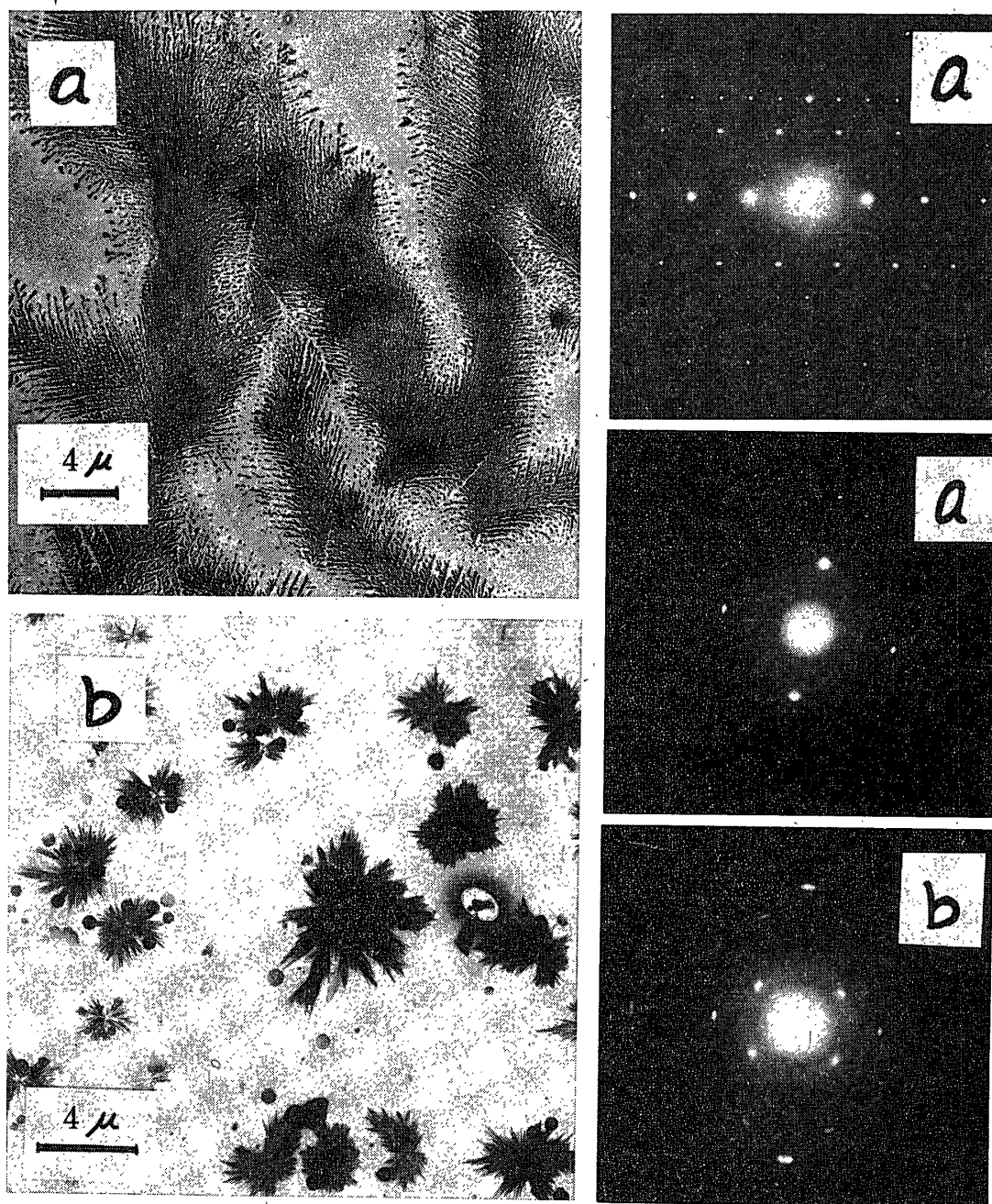


図5 高濃度硫酸溶液から生成した結晶の電子顕微鏡写真と回折像

a:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液

b:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — $\text{CaCl}_2$  溶液

## 2. 低濃度硫酸溶液からの結晶

硫酸によって結晶化させた場合、X線回折では硫酸の回折ピークが出てくるのに、電子線回折のとき表われないのは、電子顕微鏡内では真空状態であるために、硫酸が揮発してしまうためと考えられる。これは、添加された硫酸が、それ自身の結晶として大量に成長していたという証拠にもなる。

## 3. 高濃度硫酸及び塩化カルシウム溶液からの結晶 硫酸—硫酸溶液からの結晶が、硫酸カルシウムある

いは塩化カルシウム、または、それらの含水塩等のカルシウム塩を含んでいるということは、ゲルロ過し、かつ、その後に結晶化のために添加した硫酸の量とは関係なく、すでに存在していたことを示している。すなわち、酵素精製の初期段階で添加されたカルシウム塩、すなわち、塩化カルシウムがそのままの状態で残っていて、添加された硫酸と結合したのか、あるいは、酵素の硫酸塩析のために添加された硫酸とで硫酸カルシウムを形成したとも考えられることができ

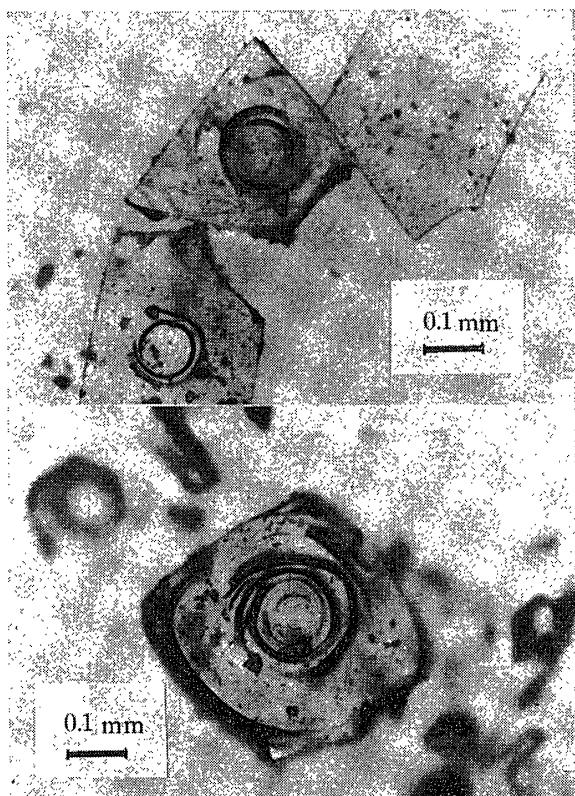


図6 糖化酵素画分のアセトンパウダー中に存在する大小の結晶の顕微鏡写真

るし、また、Ca-酵素<sup>17,18)</sup>である糊精化酵素が、Caをその分子内に取り込んでいた(吸着も含む)のが、ゲル化によって希薄溶液になったために、結晶化用に添加された硫酸と結合したのかもしれない。これらの事柄は、糊精化酵素の構造そのものとも密接に関連することになるので、さらに一層の追求が必要であると考えられる。硫酸-塩化カルシウム溶液からの結晶が無水硫酸カルシウムであるということは、やはり、上述と同じ種々の理由から考えられるので、結晶化用の塩化カルシウムを添加したためであると一概に言うことはできない。一方、これらの結晶化では、添加無機物以外の結晶は、電子顕微鏡でははっきりと見つけ出されなかった。いづれも、もやもやとした形をなしていて、ハロ現象をおびた回折像をいくつか見つけたが、解析するに十分な回折像は得られなかった。一般に、結晶生成には、大きく分けて二通りの方法がある。一つは核形成のための方法で、他方は結晶成長のための方法である。溶液からの結晶成長の場合、まず核となるものが必要となる。その核となるものは、酵素蛋白質結晶自身がなり得るか、または、他の既知物質、たとえば、今回の硫酸に相当する物質を必要とするかは、その目的とする結晶の成長の容易さによっ

て異なる。酵素のような高分子蛋白質は、構造が複雑であると想像される。そうならば、酵素蛋白質がそれ自身で結晶化し成長するには、非常な時間を要することになる。ましてや、その希薄溶液中では、一層困難になる。そのために、まず、結晶生成に必要な核を他の物質で置きかえて、結晶成長の補助をしてやる。ところが、この補助物質の濃度が高ければ、補助物質それ自身の結晶が数多く生成し、そのため、酵素蛋白質が核とするべき数が無数となり、酵素蛋白質結晶の成長度が悪くなる。そのために、電子線・X線ともに回折強度が悪くなると考えられる。今回の実験での硫酸濃度によって、このことがあきらかになった。

## V 結 言

甘藷の精製酵素液に、アセトン、あるいは、硫酸溶液及び塩化カルシウム溶液を添加して、結晶を生成させることはできるが、得られた結晶が、澱粉分解酵素結晶であるかどうかは、現在のところ、特にそれについて解析をしていないのでわからない。しかし、添加した無機物質から考えられる無機化合物をはぶいたもののX線及び電子線回折像は、最大面間隔 13.18, 31.5, 15.7, 8.69, 22.1 Å 等を示した。蛋白質結晶の場合、複雑な構造をとっていると予想されるので、その判定は非常にむづかしくなる。結晶を生成させる場合、添加する物質の濃度は、できるだけ低い方がよく、添加されずに結晶ができるのなら、その方が望ましいと考えられる。

今回の実験に際して、X線回折装置は京都教育大学理学科のを、また、電子顕微鏡は京都大学化学研究所・水渡研究室のを、それぞれ使用させていただきました。御礼申し上げます。また、終始、御指導を賜った京都教育大学理学科の前田先生、井本先生に、そして、種々の御理解を示して下さいった本学食品学研究室の大崎先生をはじめとする先生方に、御礼申し上げます。最後に、電子顕微鏡の測定や文献貸与を始めとして、文字で書けない程の御指導・御厚意を賜った京都大学化学研究所・水渡研究室の村田幸夫氏に、心から御礼を申し上げます。

## 引 用 文 献

- 1) 安藤等編：生化学研究法，500～572，朝倉書店(1972)
- 2) 小倉安之編：酵素学の基礎，73～152，朝倉書店(1972)

- 3) 山田英智：化学と生物, 11, No.8, 534~542 (1973)
  - 4) J. Dubochet *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, 36, 465~427 (1973)
  - 5) F. P. Ottensmeyer: *Biophysical J.*, 9, 1144~1149 (1969)
  - 6) 大井：紀要, No. 3, 142~146 (1972)
  - 7) V. R. Matricardi *et al.*: *Science.*, 177, 268~270 (1972)
  - 8) 植田夏：電子顕微鏡技術基礎講座 No. 2 テキスト (日本電顕学会関西編), 18~21 (1973)
  - 9) G. H. Stout *et al.* 著, 飯高訳：X線構造解析の実際, 68~73, 東京化学同人 (1972)
  - 10) 大井：紀要, No. 2, 162~166 (1971)
  - 11) 飯田等編：物理測定技術2, 結晶解析, 127~145, 朝倉書店 (1973)
  - 12) 11), 75~77.
  - 13) "A. S. T. M. Diffraction Data File," The American Society for Testing Materials., 1-1104, 1-0989, 1-0338, 6-0226, 6-0046, 8-0077, 21-0816.
  - 14) 植田夏：電子顕微鏡と材料科学テキスト (日本電顕学会関西編), 31~48 (1971)
  - 15) 8), 12~16.
  - 16) 11), 28~32.
  - 17) 福本, 山本：酵素化学シンポジウム, 14, 315~318 (1960)
  - 18) 山本, 福本：科学と工業, 33, 170~184 (1959)
- 注1 TCNQ: 7, 7, 8, 8-Tetracyanoquinodimethane  
 $(\text{NC})_2\text{C} : \text{C}_6\text{H}_4 : \text{C}(\text{CN})_2$